

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Virologie der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. P. Naumann

Untersuchungen zur Bestimmung des Antistreptolysin O Gehaltes im Serum Ein Methoden – und Reagenzienvergleich

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Wilhelm Friedrich Burbach

1980

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Virologie der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. P. Naumann

Untersuchungen zur Bestimmung des Antistreptolysin O Gehaltes im Serum Ein Methoden – und Reagenzienvergleich

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Wilhelm Friedrich Burbach

1980



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Referent
gez. : Prof. Dr. Naumann

gez. : Prof. Dr. Krüskemper

Korreferent
gez. : Priv.-Doz. Dr. Trobisch

Meiner Frau gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1	Untersuchungsmaterial	3
2.2	Reagenzien zum Nachweis von Antikörpern gegen Streptolysin O	3
2.3	Alselverlösung zur Konservierung der Kaninchen = erythrozyten	4
2.4	Modifizierte Drabkin'sche Lösung	4
2.5	Reagenzien zur Fällung unspezifischer Hämolyse = hemmfaktoren	4
2.6	Prinzip der Antistreptolysinreaktion	5
2.7	Herstellung der 5 %igen Erythrozytensuspension	6
2.8	Methoden	7
2.8.1	Vorverdünnung und Vorbehandlung der Seren	7
2.8.2	Herstellung der Serumverdünnungsreihen	8
2.8.3	Testdurchführung	9
2.8.4	Ablesemodus	9
2.9	Auswertung der Ergebnisse laut Firmenvorschrift	10
2.10	Statistisches Prüfverfahren	12
3.	Ergebnisse	13
3.1	Reproduzierbarkeit der Testergebnisse	13
3.2	Häufigkeitsverteilungen der ermittelten Anti = streptolysintiter	13
3.3	Geometrische Mittelwerte der Antistreptolysin = titer der 100 untersuchten Seren	18
3.4	Vergleich der ermittelten Antistreptolysintiter bei Verwendung der verschiedenen Testsätze im Nativserum und nach den Fällungsmethoden	19
3.5	Einfluß der Fällungsmethoden auf den Antistrep = tolysintiter bei den jeweils verwendeten Test = sätzen	24

3.6	Vergleich der mit BAG und HYL Testsatz in der Routinemethode ermittelten Antistreptolysin = titer mit denen, die mit dem BEH Testsatz nach Fällung erzielt wurden	28
4.	Diskussion der Ergebnisse	33
5.	Zusammenfassung	39
6.	Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

Bei der serologischen Abklärung einer Streptokokken =
infektion, insbesondere auch einer Streptokokkensen =
sibilisierung im Rahmen einer Zweiterkrankung wird der
Aussagewert einer Antistreptolysinreaktion im Einzel =
fall durch verschiedene Faktoren eingeschränkt.

Bei ca 20% der Fälle mit rheumatischem Fieber kommt es
nicht zu der erwarteten Erhöhung des Antistreptolysin =
titers (1, 34, 40, 64, 65, 67, 71, 75).

Auch bei der akuten Glomerulonephritis im Anschluß an
einen Streptokokkenhautinfekt ist mit einem Anstieg des
Antistreptolysintiters nur in 50% der Fälle zu rech =
nen (13, 39).

Auf der anderen Seite muß man jedoch auch mit dem Auf =
treten falsch positiver Antistreptolysinreaktionen in =
folge einer unspezifischen Hemmung der Hämolyse durch
Streptolysin O bei Hyperlipoproteinämien (45, 54, 63,
69), Hepatitis (16, 17, 25, 43, 44, 68), dekompen =
sierter Rechtsherzinsuffizienz (26) und bei bakteriell
verunreinigten und hämolytischen Seren (21, 38, 42, 44,
51) rechnen.

Als Möglichkeiten zur Spezifizierung des Aussagewertes
der Antistreptolysinreaktion bieten sich an

1. die Bestimmung anderer humoraler Reaktionspro =
dukte bei Streptokokkeninfektionen, wie z.B. der
Antistreptokinase, der Antihyaluronidase, der
AntistreptoDORNase und der AntistreptoNADase (31,
71, 72),
2. die Ausschaltung der unspezifischen Streptolysin O
Inhibitoren durch Dextransulfat (7) oder Iso =
amylalkohol (4),

3. die passive Hämagglutination, wie z.B. der Latex Test (3, 29, 41, 58) oder der Blue ASO Test (9, 53) und

4. der Streptozym Mischtest (12, 31).

Während sich die Antikörperbestimmungen gegen die anderen extrazellulären Stoffwechselprodukte der Streptokokken bisher noch nicht in allen Laboratorien durchsetzen, bzw. wegen ihres größeren methodischen Aufwandes Speziallabo = ratorien vorbehalten bleiben müssen, wird trotz ihrer Nachteile die Antistreptolysinreaktion in den meisten Laboratorien bei der Serodagnostik von Streptokokken A Infektionen und nichteitrigen Streptokokkenfolgekrank = heiten wie akutes rheumatisches Fieber, akute Glomerulo = nephritis und Chorea minor durchgeführt. Insbesondere, da in vielen Fällen ein kultureller Nachweis von A Strepto = kokken wegen einer mehr oder weniger langen Latenzzeit zwischen dem akuten Infekt und dem Auftreten der Folge = krankheit nicht mehr gelingt (75).

Die Ausführung der meisten heute üblichen Antistreptoly = sin Nachweismethoden richtet sich nach dem erstmals von TODD beschriebenen Hämolyseneutralisationstest, bei dem Erythrozyten als Indikator für eine durch die serologische Reaktion bewirkte Hemmung der Toxizität des Streptoly = sin O Reagenzes dienen (73).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die Ergebnisse der Antistreptolysin O Bestimmungen mit ver = schiedenen handelsüblichen Reagenziensätzen, die als Reaktionsergebnis eine komplette Hämolysehemmung (HY = LAND und BAG) bzw. eine beginnende Hämolyse (BEHRING) ablesen, vergleichbar sind, und ob der Einfluß der Lipo = proteinfällung mit Dextransulfat oder Isoamylalkohol bei den jeweils verwendeten Testsätzen unterschiedlich ist.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Es wurden Seren von 100 Patienten ausgewählt. Bei allen Patienten bestand entweder auf Grund klinischer oder serologischer Befunde der Verdacht auf eine Infektion mit A Streptokokken.

Alle Seren wurden bei - 20°C bis zu maximal 3 Monaten aufbewahrt und vor der Untersuchung hitzeinaktiviert.

2.2 Reagenzien zum Nachweis von Antikörpern gegen Streptolysin O

Biologische Arbeitsgemeinschaft, gamma diagnostics (im folgenden abgekürzt als BAG bezeichnet) :

Streptolysin - O, Ch. 40509

Anti - Streptolysin - O - Standard, Ch. 41506

Streptolysin - O - Pufferkonzentrat, Ch. 41003

Behringwerke AG (im folgenden abgekürzt als BEH bezeichnet) :

Streptolysin O - Reagenz, ORH⁸⁰₈₁ K.-/B. No 10.100

Anti - Streptolysin O - Serum, ORH¹⁶₁₇ K.-/B. No 5201 D

Phosphat - Pufferlösung - Konzentrat, ORB⁴⁴₄₅ O.P.-B. No 172

Natriumthioglykolat (0,3 mol/l) No 5323

Hyland, Travenol GmbH (im folgenden abgekürzt als HYL bezeichnet) :

Streptolysin - O - Reagenz, Ch. Nr 0363Poo1 AA

Streptolysin - O - Pufferkonzentrat, Ch. Nr BV 10 S8

Antistreptolysin - O - Kontrolle, Ch. Nr 0361Poo5 AA

2.3 Alselverlösung zur Konservierung der im Test eingesetzten Kaninchenerythrozyten (59) :

Glucose 24,60 g

Natriumcitrat 9,60 g

Natriumchlorid 5,04 g

Aq. bidest. ad 1200 ml

mit Citronensäure auf pH 6,1 eingestellt

- 2.4 Modifizierte Drabkin'sche Lösung zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration in der Erythrozytengebrauchs = lösung (14, 50):

Kaliumferricyanid	0,200 g
Kaliumcyanid	0,050 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,140 g
Sterox	0,5 ml
Aq. bidest.	ad 1000 ml

- 2.5 Reagenzien zur Fällung unspezifischer Hämolysehemmfaktoren (7, 4) :

10 %ige Dextransulfatlösung (10 g Sodium Dextran Sulfate 500 der Fa Pharmacia Uppsala, Lot. No 2223 in 100 ml Aq. bidest. aufgelöst und 45 min bei 110°C auto = klaviert).

Isoamylalkohol p. a. Merck

2.6 Prinzip der Antistreptolysinreaktion

Zu den verschiedenen Verdünnungen des zu prüfenden Serums wird eine konstante Menge Streptolysin O zugegeben.

Das im Probandenserum enthaltene Antistreptolysin O reagiert spezifisch mit seinem Antigen, dem Streptolysin O. Die spezifische Reaktion hebt die hämolytische Aktivität des Streptolysin O auf.

Anschließend werden Testerythrozyten zugesetzt. In den Verdünnungsbereichen, in denen das zugesetzte Streptolysin O nicht durch das im Patientenserum enthaltene Antistreptolysin O gebunden und inhibiert wurde, ist es aktiv und hämolysiert die Testerythrozyten.

Während beim BEH Testsatz als Ergebnis abgelesen wird, welche Menge des Standard - bzw. Patientenserums die hämolytische Wirkung des zugesetzten Streptolysin O Reagenzes neutralisiert hat, und durch Vergleich der Mengenverhältnisse berechnet wird, wieviel Einheiten Antistreptolysin O das zu untersuchende Serum im Vergleich zum bekannten Standard enthält, dient das Kontrollserum bei HYL zur Überprüfung für ein einwandfrei arbeitendes Testsystem.

2.7 Herstellung der 5 %igen Erythrozytensuspension

Die im Test verwendeten Kaninchenerythrozyten wurden wöchentlich frisch durch Herzpunktion gewonnen und bis zum Gebrauch als 10 %ige Aufschwemmung in Alselverlösung aufbewahrt.

Aus dieser Konserve wurde die 5 %ige Erythrozytensuspension für jede Untersuchungsserie neu zubereitet, modifiziert nach HALLMANN und BURKHARDT (19) :

Für 20 ml Erythrozytensuspension werden 12 ml der Konserve dreimal mit dem sechsfachen Volumen physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Man zentrifugiert die Erythrozyten jeweils 10 min mit 250 g, saugt den Überstand ab, schüttelt die Erythrozyten erneut auf und zentrifugiert wieder. Zeigt der Überstand nach dem dritten Waschvorgang noch eine Spur Hämolyse, werden die Erythrozyten verworfen. Das nach dem letzten Waschvorgang verbliebene Erythrozytensediment wird mit Puffer auf 20 ml aufgefüllt. Anschließend wird der Hämoglobingehalt der Erythrozytensuspension bestimmt.

Dazu wird das Hämoglobin von 0,5 ml dieser Suspension mit 9,5 ml modifizierter Drabkin'scher Lösung in Cyanhämglobin überführt und nach 10 min Reaktionszeit die Extinktion bei 540 nm gegen Aq. bidest. gemessen (Eppendorf Photometer, Filter Hg 546).

Durch Vorversuche wurde die Extinktion einer 1 : 10 mit modifizierter Drabkin'scher Lösung verdünnten 5 %igen Kaninchenerythrozytensuspension mit 0.500 ermittelt. War der gemessene Extinktionswert > 0.500, und somit die Erythrozytenkonzentration in der Gebrauchsverdünnung höher als 5 %, erfolgte durch Zugabe von Pufferlösung die genaue Einstellung.

2.8 Methoden

Die Bestimmung des Antistreptolysintiters mit den verschiedenen Testsätzen erfolgte im Mikrotitersystem (5, 15, 30, 32, 52, 61).

Zusätzlich zur allgemein üblichen Technik ohne eine Vorbehandlung des Serums (im folgenden als Routinemethode, abgekürzt R, bezeichnet), wurde jedes Serum noch nach Vorbehandlung mit Dextransulfat (im folgenden als Dextransulfatmethode, abgekürzt DS, bezeichnet) und Isoamylalkohol (im folgenden als Isoamylalkoholmethode, abgekürzt I, bezeichnet) untersucht.

Die Fällungen zur Ausschaltung unspezifischer Hämolysehemmfaktoren mit Dextransulfat nach dem Prinzip von BURSTAIN und SAMAILLE (7) und mit Isoamylalkohol nach BADIN und BARILLEC (4) wurden in einer Abwandlung des Verfahrens und an vorverdünnten Seren vorgenommen.

Die vergleichenden Untersuchungen der Seren wurden parallel unter Anwendung aller Methoden und Testsätze durchgeführt.

2.8.1 Vorverdünnung und Vorbehandlung der Seren

Alle Seren wurden im Wasserbad 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

Die Puffergebrauchslösung entsprach jeweils den Herstellervorschriften für die verwendeten Testsätze.

Routinemethode

inaktiviertes Serum	0,100 ml
Puffer	2,400 ml

Dextransulfatmethode

inaktiviertes Serum	0,100 ml
10 %ige Dextransulfatlösung	0,025 ml
1 M Calciumchloridlösung	0,075 ml
Puffer	2,300 ml

60 min bei Raumtemperatur stehen lassen, zwischen =
zeitlich mehrfach aufschütteln und dann 10 min bei
1500 g zentrifugieren. Der Überstand wurde als eine
1 : 25 Serumvorverdünnung weiterverwendet.

Isoamylalkoholmethode

inaktiviertes Serum	0,100 ml
Puffer	2,400 ml
Isoamylalkohol	2,500 ml

10 min bei Raumtemperatur stehen lassen, mehrfach
aufschütteln und dann 10 min bei 1500 g zentrifugie =
ren. Mit Pipette flottierende Fettschicht durch =
stoßen und benötigte Menge Serumvorverdünnung 1 : 25
entnehmen.

2.8.2 Herstellung der Serumverdünnungsreihen mit dem Mikro = titersystem

Zur Vereinheitlichung der Arbeitstechnik wurden zwei
Serumverdünnungsreihen 1 : 25 und 1 : 75 in geometrischer
Reihe zur Basis 2 mit dem Mikrotitersystem angelegt, ent =
sprechend einer Titerdifferenz zwischen zwei Serumverdün =
nungsstufen von $\log_{10} 0,175$ bzw. $0,125$.

Dabei ergeben sich folgende Serumverdünnungen 1 : 25,
1 : 50, 1 : 75, 1 : 100, 1 : 150, 1 : 200, 1 : 300,
1 : 400, 1 : 600, 1 : 800, 1 : 1200 und 1 : 1600.

2.8.3 Testdurchführung

Es wurden in der Mikromethode denen von den Testsatzherstellern für die Makrotechnik empfohlenen Reagenzien - und Serummengen proportionale Reaktionsvolumina eingesetzt

		BAG	BEH	HYL
Serumverdünnung	in µl	50	50	50
SLO - Reagenz	in µl	25	50	25
5 %ige Ery - Suspension	in µl	25	25	25

Unterschiedliche Inkubationszeiten bei der Reaktion zwischen im Serum vorhandenem Antistreptolysin O und dem zugesetzten Streptolysin O, sowie zwischen nicht neutralisiertem Streptolysin O und den als Indikator zugesetzten Erythrozyten wurden entsprechend den Vorschriften der Firmen für die Makromethode genau beachtet.

		BAG	BEH	HYL
Inkubationszeit nach SLO - Zugabe	in min	15	25	15
Inkubationszeit nach Ery - Zugabe	in min	45	45	45

2.8.4 Ablesemodus

BAG und HYL

Nach Inkubation wurde 1 min mit 250 g zentrifugiert (32). Als Reaktionsergebnis wurde die Verdünnung des Patienten = serums abgelesen, bei der noch eine komplette Hämolyse = hemmung vorlag, der Überstand also vollkommen klar war.

BEH

Abgelesen wurde die Serumverdünnung, bei der eine gerade

beginnende Hämolyse sichtbar war.

Entgegen der Empfehlung bei der Anwendung der Makromethode, die Erythrozyten sedimentieren zu lassen, wurde 1 min bei 150 g zentrifugiert, wie es auch von STÖRIKO (62) zur genaueren Ablesung bei der Verwendung von BEH Reagenzien in der Mikromethode vorgeschlagen wird.

2.9 Auswertung der Ergebnisse laut Firmenvorschrift

BAG

Der Antistreptolysin O Standard der Firma BAG ist ein lyophilisiertes Kontrollserum, das nach Aufbereitung mit 10 ml Aq. bidest. einer 1 : 100 Serumverdünnung eines Serums mit einem Antistreptolysintiter von 166 I.E./ml entspricht. Nach Angabe des Herstellers muß dieser Standard immer das zugesetzte Streptolysin O bis zu einer Verdünnung von 1 : 166 neutralisieren, während in der 1 : 250 Verdünnung dieses Standards die Antistreptolysinmenge zur Hämolysehemmung nicht mehr ausreicht. In diesem Falle ist der Antistreptolysintiter des Patientenserums, ausgedrückt in I.E./ml, der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung, bei der das zugesetzte Streptolysin O noch komplett neutralisiert wird. Zeigt der Standard die komplette Neutralisation jedoch in einer anderen Verdünnungsstufe, so errechnet sich der Titer des Patientenserums nach folgender Formel :

$$(\text{Titer Patient} / \text{Titer Standard}) \times 166$$

Die arithmetische Titrationsreihe, wie in der Makromethode für die Titerbestimmung des Standards vorgeschrieben, wurde wie folgt in die Mikromethode übertragen :

ASL - Standard	in μ l	50	40	30	20	10
Puffer	in μ l	-	10	20	30	40
		1:100	1:125	1:166	1:250	1:333

BEH

Das Antistreptolysin O Serum der Firma BEH ist ein auf 10 I.E./ml eingestelltes Humanserum (Substandard des Internationalen Standards des Staatlichen Seruminstitutes Kopenhagen). Für die Bestimmung der Antistreptolysin - Konzentration im Standardserum, die das zugesetzte Strep = tolysin O nicht mehr völlig neutralisiert, wurden zwei Ausgangsverdünnungen mit einem Antistreptolysingehalt von 1,0 und 1,5 I.E./ml hergestellt.

Von diesen beiden Ausgangsverdünnungen wurde in der Mikrotechnik je eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 hergestellt :

Reihe 1	1,500 I.E./ml
Reihe 2	1,000 I.E./ml
Reihe 3	0,750 I.E./ml
Reihe 4	0,375 I.E./ml
Reihe 5	0,250 I.E./ml

Aus der Antistreptolysin O Konzentration des Standardserums und dem Verdünnungsgrad des Patientenserums, das einen gleichen Hämolysegrad aufweist, kann der Antistreptolysingehalt des Patientenserums in I.E./ml berechnet werden.

HYL

Bei der Antistreptolysin - O - Kontrolle der Firma HYL handelt es sich um ein indirekt standardisiertes Gamma = globulin aus menschlichem Plasma, das als Kontrolle bei der Serumtitration mitgeführt wird. Nach Rekonstituierung mit 10 ml Aq. bidest. ist sie als 1 : 100 Serumverdünnung zu betrachten. 0,6 ml gebrauchsfertige Lösung, in der Mikrotechnik 30 µl entsprechend, verhält sich bei der Testdurchführung wie ein Serum mit einer Antistreptolysin = sinkonzentration von 166 I.E./ml und neutralisiert die in 0,5 ml, entsprechend in der Mikrotechnik die in 25 µl

enthaltene Toxinmenge.

Anders als bei BAG und BEH, die den Standard zur Normierung der Antistreptolysinreaktion benutzen, soll die Antistreptolysin O Kontrolle bei HYL zusammen mit einer Erythrozyten - und Streptolysin O Kontrolle als Maß für die Qualität des Testsystems dienen.

Bei HYL ist die hämolytische Aktivität des Streptolysin O Reagenzes gegen den Internationalen Standard eingestellt : bis zu einer Verdünnung von 1 : 166 muß diese Kontrolle das zugesetzte Streptolysin O neutralisieren, und in einer Verdünnung von 1 : 250 und höher muß eine Hämolyse eintreten.

Die Titration des Kontrollserums erfolgte wie bei BAG beschrieben.

2.10 Statistisches Prüfverfahren

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurde mit dem Zeichen - Rangsummen - Test für gleichartige Paare von WILCOXON durchgeführt (76).

Als obere Signifikanzgrenze wurde $\alpha = 0,05$ gewählt. Da je doch insgesamt 16 statistische Tests auf das gleiche Untersuchungsmaterial angewandt wurden, mußte α für den Einzeltest adjustiert werden durch $\alpha' = \alpha / 16 = 0,003$. Im folgenden bezieht sich die Aussage " signifikanter Unterschied " auf das adjustierte α' .

3. Ergebnisse

3.1 Reproduzierbarkeit der Testergebnisse als Maß für die Präzision der Testdurchführung

Nach HALL und FELKER kann eine serologische Antikörper = bestimmung dann als reproduzierbar bezeichnet werden, wenn bei Mehrfachbestimmungen des Titers eines Serums mindestens 95 % der Ergebnisse nicht mehr als eine Ver = dünnungsstufe voneinander abweichen (18).

In Vorversuchen wurde zur Kontrolle der Reproduzierbar = keit unserer Testdurchführung ein Poolserum mit den Testsätzen der Firmen BAG, BEH und HYL untersucht.

In 40 Analysen dieses Poolserums an verschiedenen Tagen ergaben sich keine Abweichungen des Antistreptolysin = titers um mehr als eine Verdünnungsstufe innerhalb eines Testsatzes.

Auch durch die Einführung eines weiteren Arbeitsschrit = tes, der Vorbehandlung des Poolserums mit Dextransulfat oder Isoamylalkohol, war die Schwankungsbreite der Test = resultate nie größer als eine Verdünnungsstufe.

3.2 Häufigkeitsverteilungen der ermittelten Antistreptolysin = titer

Die Häufigkeit des Vorkommens der in den verschiedenen Methoden mit den drei Testsätzen ermittelten Antistrepto = lysinwerten der 100 untersuchten Seren ist in den Abb. 1, 2 und 3 dargestellt.

In der Routinemethode zeigt sich, daß bei der Verwendung des Testsatzes der Firma BEH 42 % der untersuchten Seren einen Antistreptolysintiter > 400 I.E./ml haben (Abb. 1).

Abb. 1 : Häufigkeitsverteilung der mit den verschiedene =
nen Firmenreagenzien ermittelten Antistrepto =
lysinwerte bei 100 untersuchten Seren in der
Routinemethode

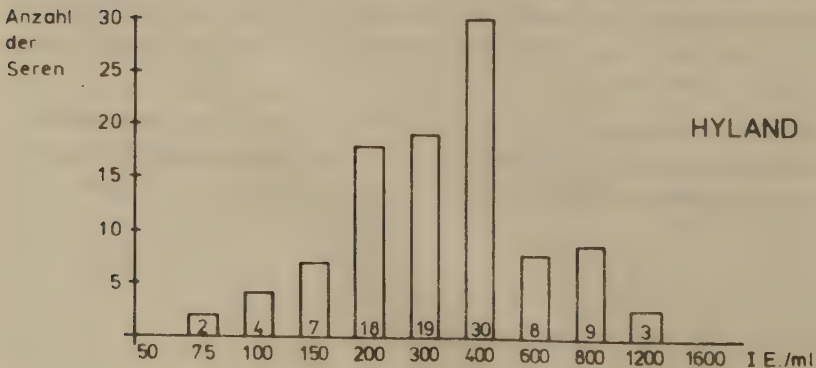
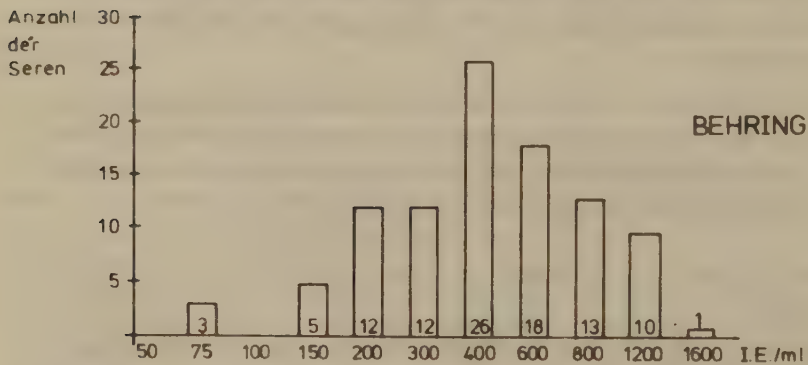
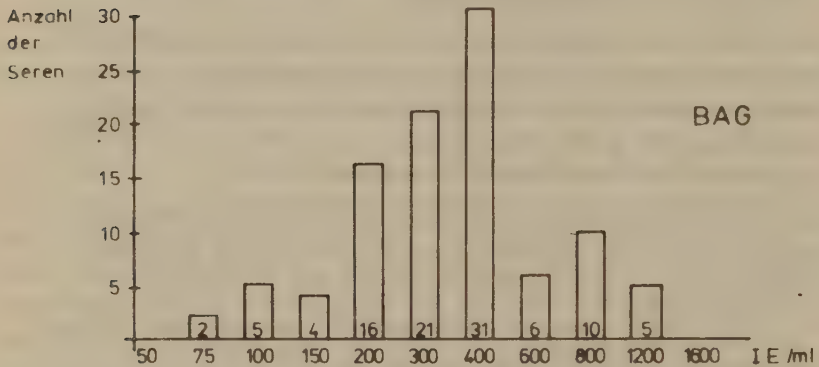


Abb. 2 : Häufigkeitsverteilung der mit den verschiedene =
nen Firmenreagenzien ermittelten Antistrepto =
lysinwerte bei 100 untersuchten Seren in der
Dextransulfatmethode

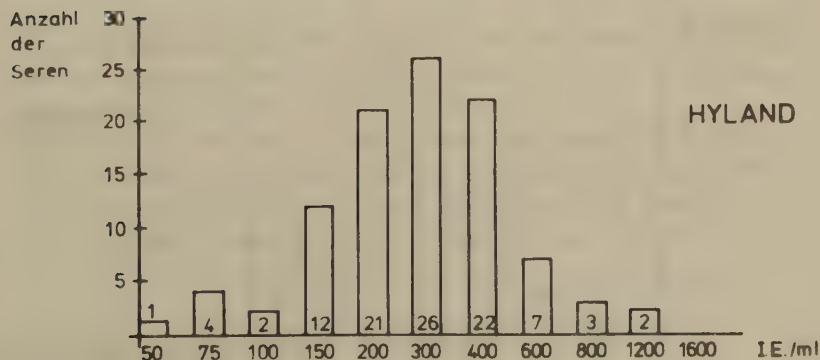
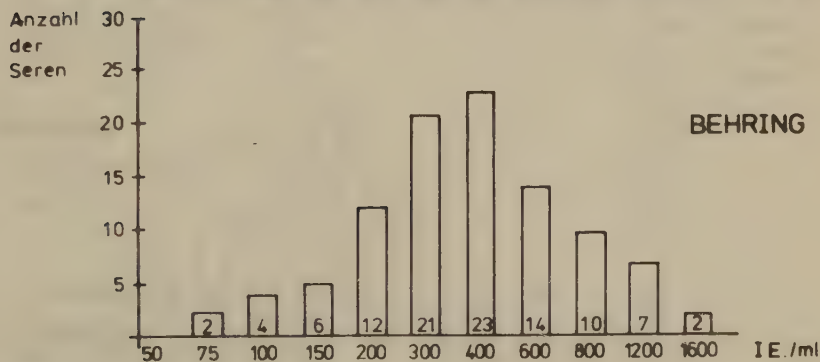
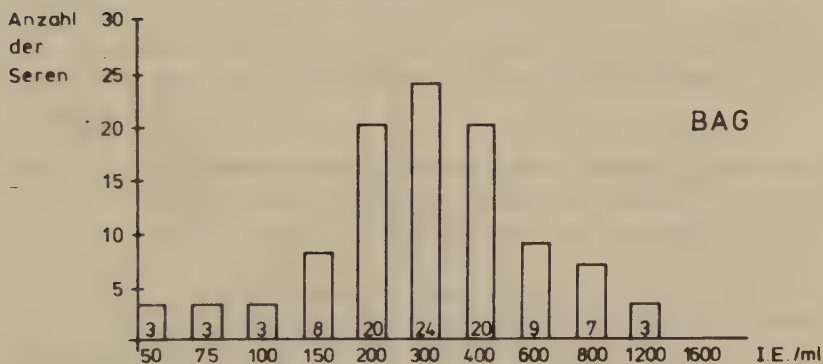
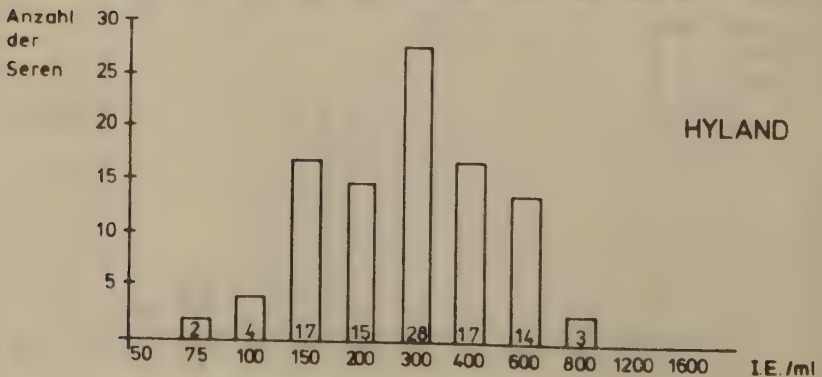
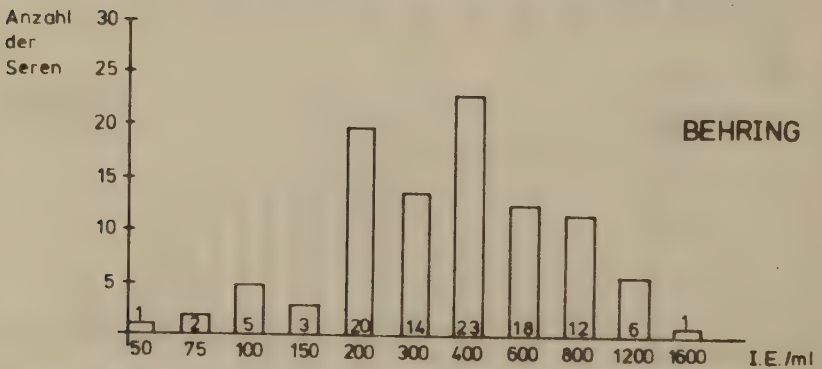
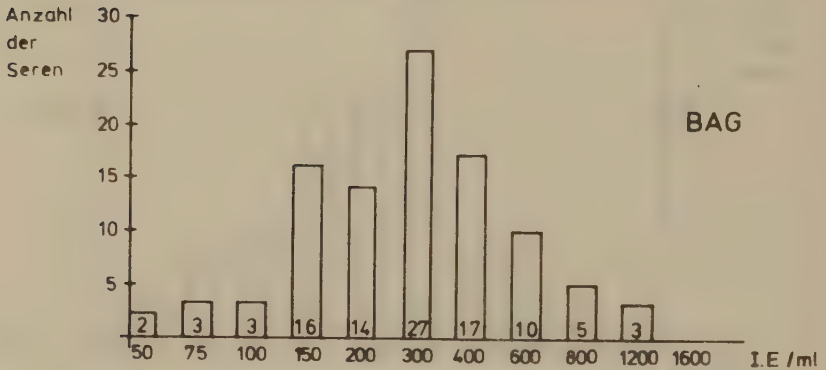


Abb. 3 : Häufigkeitsverteilung der mit den verschiedene =
nen Firmenreagenzien ermittelten Antistrepto =
lysinwerte bei 100 untersuchten Seren in der
Isoamylalkoholmethode



Im gleichen Untersuchungsmaterial finden sich dagegen bei Verwendung der Testsätze der Firmen BAG und HYL entsprechend große Antikörpermengen nur in 20 % der Fälle.

Entsprechende Befunde ergeben sich auch nach Vorbehandlung der Seren mit Dextransulfat und Isoamylalkohol (Abb. 2 und 3).

Abb. 4 : Gegenüberstellung der mit den Testsätzen in den verschiedenen Methoden untersuchten Seren mit einem Antistreptolysingehalt > 400 I.E./ml

	angewandter Testsatz	Anzahl der Seren mit einem ASL - O Gehalt > 400 I.E./ml in %
Routinemethode	BAG	21
	HYL	20
	BEH	42
Dextransulfat = methode	BAG	19
	HYL	12
	BEH	33
Isoamylalkohol = methode	BAG	18
	HYL	17
	BEH	32

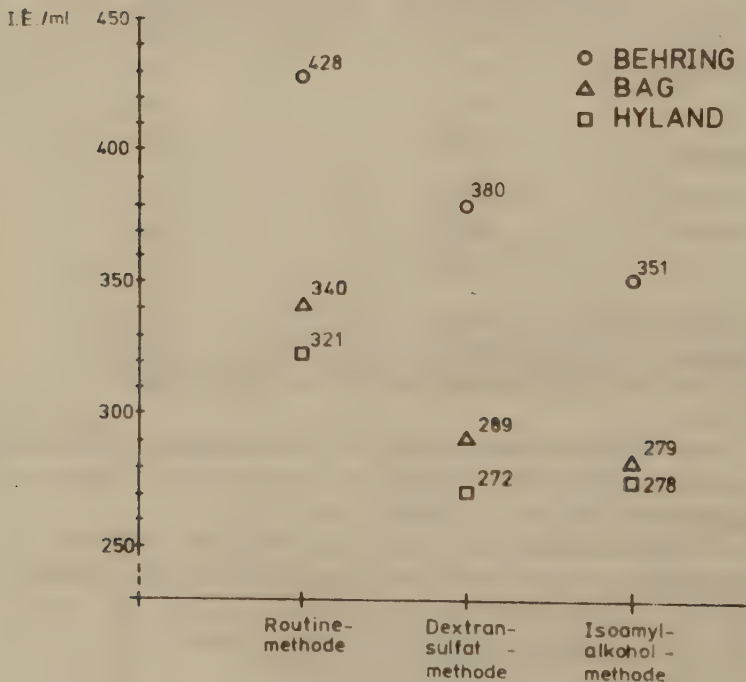
In der Routinemethode liegt der am häufigsten ermittelte Antistreptolysinwert der untersuchten Seren in allen Testsätzen bei 400 I.E./ml (Abb. 1).

Nach Vorbehandlung der Seren mit Dextransulfat und Isoamylalkohol wird dieser Häufigkeitsgipfel bei BAG und HYL auf 300 I.E./ml gesenkt, während er bei BEH auf 400 I.E./ml bestehen bleibt (Abb. 2 und 3).

3.3 Geometrische Mittelwerte der 100 untersuchten Seren

Während sich die Mittelwerte bei Verwendung der Testsätze von BAG und HYL nur geringfügig unterscheiden, unabhängig von der betrachteten Methode, liegen die entsprechenden, mit dem BEH Testsatz ermittelten Werte höher (Abb. 5).

Abb. 5 : Geometrischer Mittelwert der Antistreptolysin O Werte im Nativserum und nach Fällung mit Dextransulfat und Isoamylalkohol



Durch die Fällung der Seren mit Dextransulfat läßt sich bei Verwendung aller Testsätze eine annähernd gleiche Senkung der geometrischen Mittelwerte der untersuchten Seren erreichen (Abb. 6).

Durch die Isoamylalkoholfällung scheinen die geometrischen Mittelwerte bei Verwendung des BAG und BEH Testsatzes noch weiter gesenkt zu werden als nach Dextransulfatfällung, während dieser Effekt bei Verwendung des HYL Testsatzes nicht sichtbar ist (Abb. 4 und 6).

Abb. 6 : Einfluß der Fällungsmethoden auf den geometrischen Mittelwert der untersuchten Seren

Testsatz	Geometrischer Mittelwert in der Routinemethode (= 100 %)	Senkung des geometrischen Mittelwertes der untersuchten Seren im Vergleich zur Routinemethode in %	
		durch DS	durch Iso
BAG	340 I.E./ml	17	22
BEH	428 I.E./ml	13	22
HYL	321 I.E./ml	18	15

3.4 Vergleich der ermittelten Antistreptolysintiter bei Verwendung der verschiedenen Firmentestsätze im Nativserum und nach den Fällungsmethoden

In den Abb. 7 bis 9 sind die mit den Testsätzen der Firmen BAG und BEH ermittelten Antistreptolysintiter der Seren den mit dem HYL Testsatz ermittelten gegenübergestellt.

Die mit dem HYL Testsatz erzielten Resultate wurden willkürlich als Bezugswerte gewählt.

Abb. 7 : Vergleich der mit BAG bzw. BEH und HYL Reagen =
zien ermittelten Antistreptolysinwerte der 100
untersuchten Seren in der Routinemethode

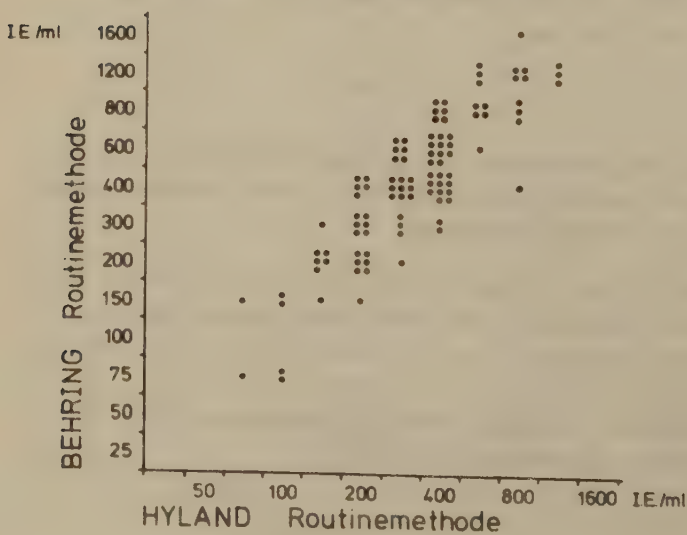
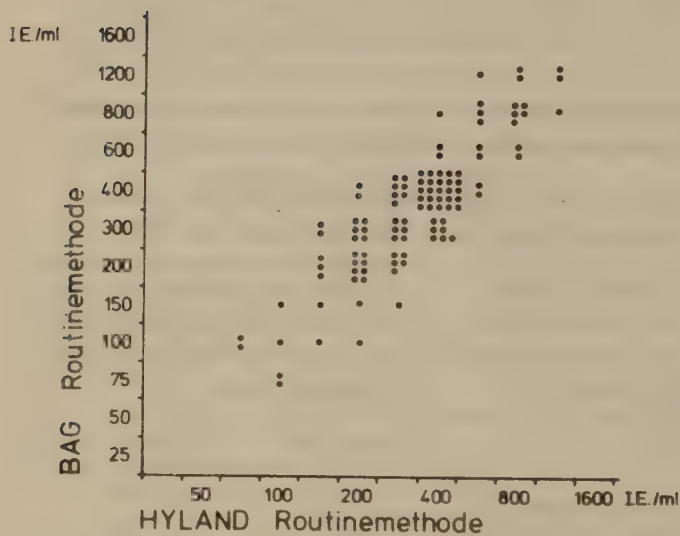


Abb. 8 : Vergleich der mit BAG bzw. BEH und HYL Reagen =
zien ermittelten Antistreptolysinwerte der 100
untersuchten Seren in der Dextransulfatmethode

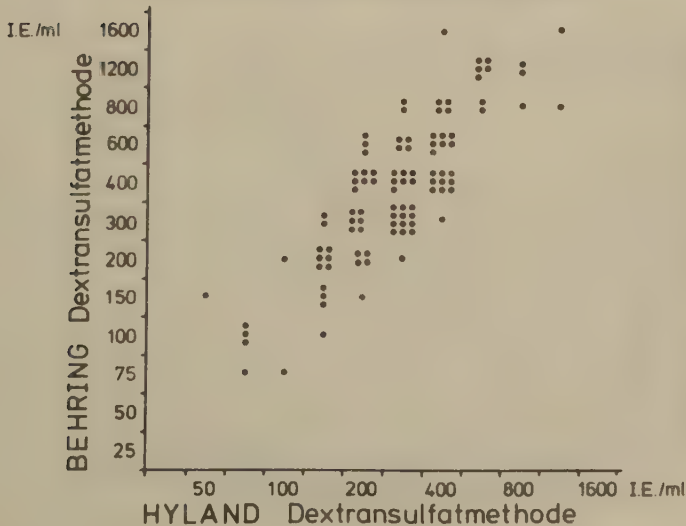
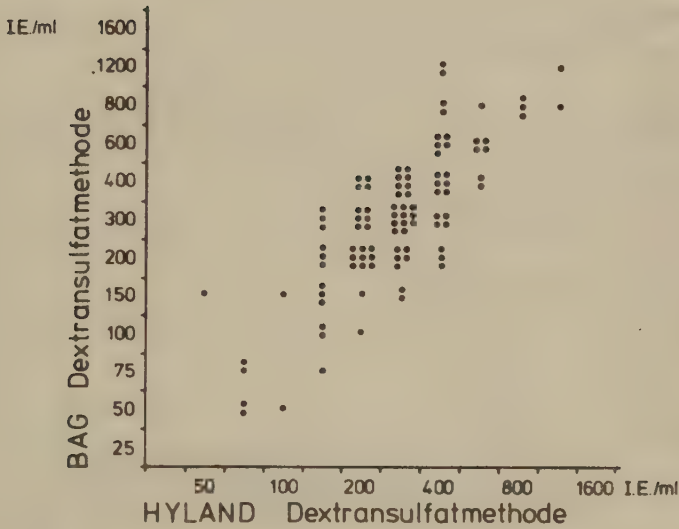
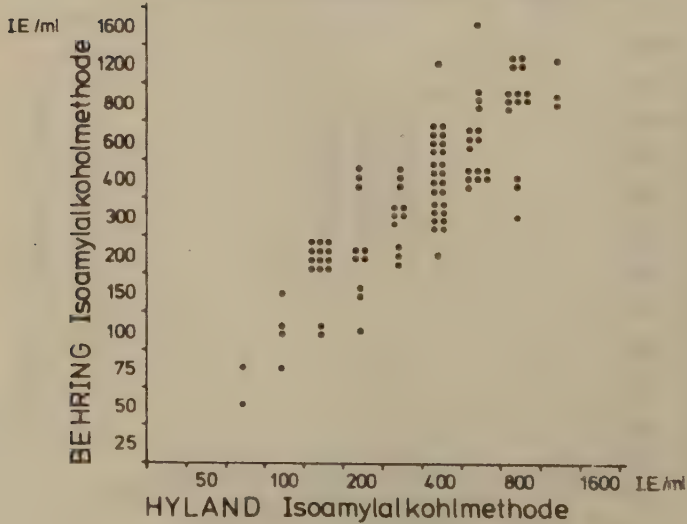
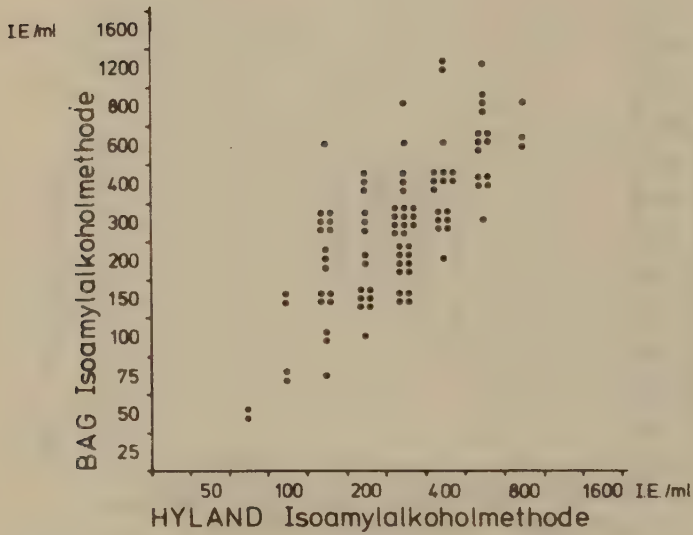


Abb. 9 : Vergleich der mit BAG bzw. BEH und HYL Reagen =
zien ermittelten Antistreptolysinwerte der 100
untersuchten Seren in der Isoamylalkoholmethode



Die bereits bei der Gegenüberstellung der geometrischen Mittelwerte der untersuchten Seren beobachteten Unterschiede bei Verwendung der verschiedenen Testsätze werden bestätigt.

Abb. 10 : Vergleich der mit den verschiedenen Testsätzen in den verschiedenen Methoden ermittelten Antistreptolysintiter, bezogen auf die entsprechenden HYL Werte

Methode	Testsatz	Anzahl der Seren in %, die sich von HYL um 1 und mehr Titerstufen unterscheiden	
		höher	niedriger
Routinemethode	BAG	32 (6) ¹	23 (2)
	BEH	64 (23)	7 (1)
Dextransulfat = methode	BAG	36 (12)	25 (8)
	BEH	64 (30)	6 (-)
Isoamylalko = holmethode	BAG	30 (15)	36 (8)
	BEH	62 (23)	14 (3)

¹ In Klammern ist der Prozentsatz der Seren angegeben, die sich in der entsprechenden Methode um 2 und mehr Titerstufen unterscheiden.

Zwischen den mit den Testsätzen der Firmen BAG und HYL ermittelten Antistreptolysintitern der untersuchten Seren bestehen nur geringe Unterschiede. Die statistische Überprüfung der Testergebnisse (zusammengefaßt dargestellt in Abb. 18) zeigt, daß sowohl in der Routinemethode ($p = 0,0489$) als auch nach Fällung der Seren mit Dextransulfat ($p = 0,205$) oder Isoamylalkohol ($p = 0,41$) keine signifikanten Unterschiede bestehen.

Die mit dem BEH Testsatz ermittelten Antistreptolysin =
werte der untersuchten Seren sind in der Routinemetho =
de und nach den Fällungsmethoden höher als die entspre =
chend mit dem HYL Testsatz erzielten Resultate. Diese
Unterschiede sind statistisch abgesichert ($p < 0,0001$).

3.5 Einfluß der Fällungsmethoden auf den Antistreptolysin = titer bei den jeweils verwendeten Testsätzen

In den Abb. 11 bis 13 sind die mit den verschiedenen
Firmentestsätzen ermittelten Antistreptolysinwerte in
der Dextransulfatmethode und der Isoamylalkoholmethode
den Werten der Routinemethode gegenübergestellt.

Abb. 11 : Vergleich der mit BAG Reagenzien in der Dex =
transulfat - bzw. Isoamylalkoholmethode ermit =
telten mit den in der Routinemethode ermittel =
ten Antistreptolysinwerten der 100 untersuchten
Seren

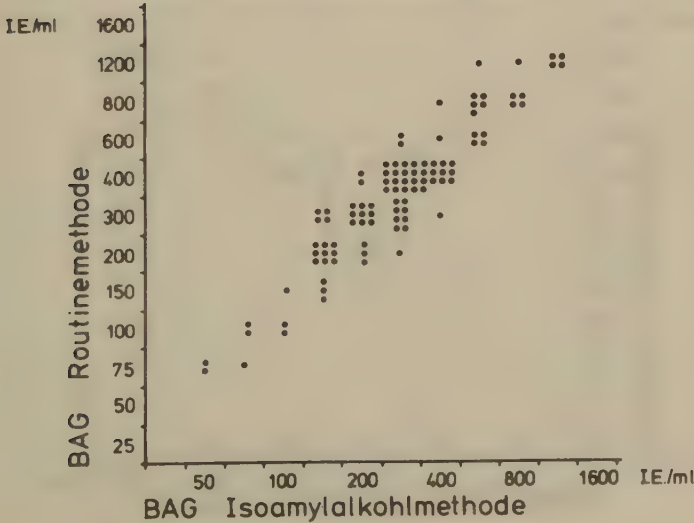
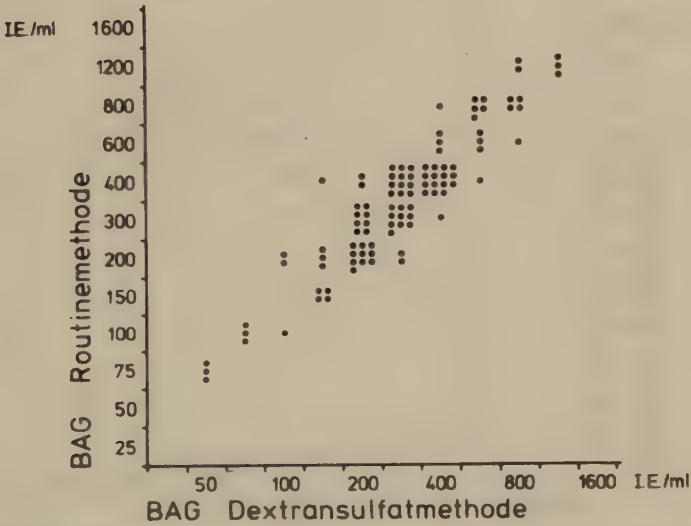


Abb. 12 : Vergleich der mit BEH Reagenzien in der Dex =
transulfat - bzw. Isoamylalkoholmethode ermit =
telten mit den in der Routinemethode ermittel =
ten Antistreptolysinwerten der 100 untersuchten
Seren

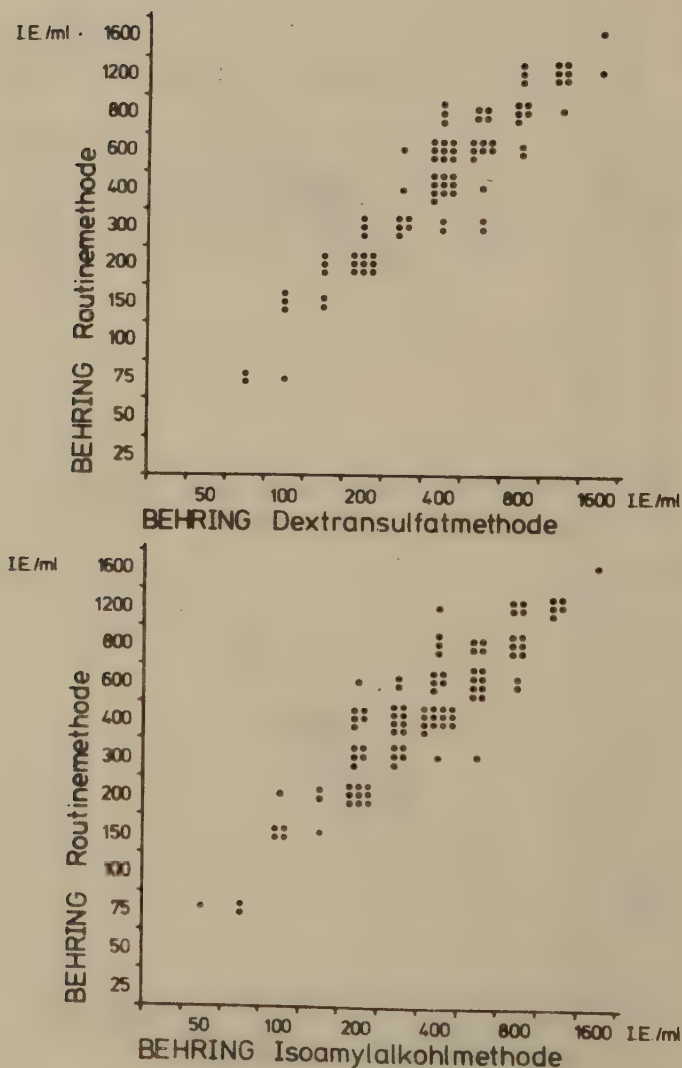


Abb. 13 : Vergleich der mit HYL Reagenzien in der Dex =
transulfat - bzw. Isoamylalkoholmethode ermit =
telten mit den in der Routinemethode ermittel =
ten Antistreptolysinwerten der 100 untersuchten
Serum

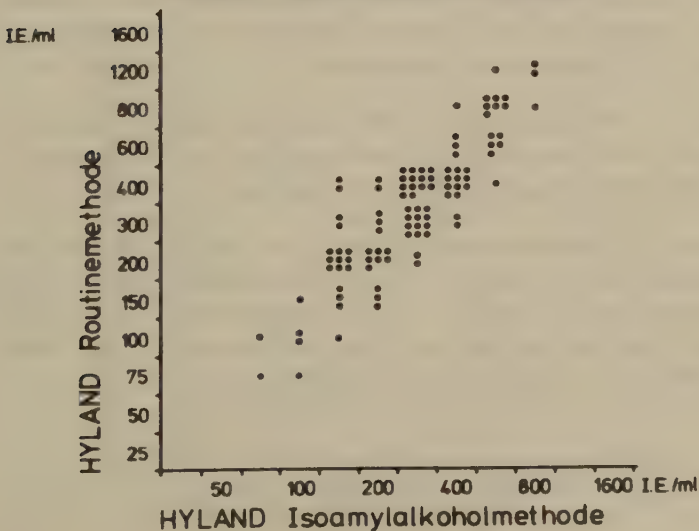
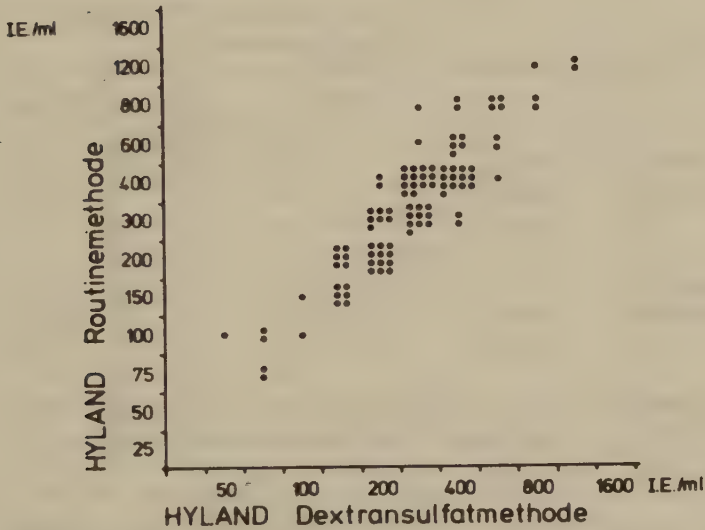


Abb. 14 : Vergleich der Serumfällungsmethoden mit der Routinemethode

Methode	Testsatz	Anzahl der Seren in %, die sich von der Routinemethode um 1 und mehr Titerstufen unterscheiden	
		höher	niedriger
Dextransul = fatmethode	BAG	5 (-) ¹	47 (6)
	BEH	10 (2)	30 (4)
	HYL	3 (-)	47 (7)
Isoamylalko = holmethode	BAG	2 (-)	56 (10)
	BEH	4 (1)	45 (13)
	HYL	10 (-)	48 (8)

¹In Klammern ist der Prozentsatz der Seren angegeben, die sich um 2 und mehr Titerstufen unterscheiden.

Durch die Fällung der Seren mit Dextransulfat und mit Isoamylalkohol läßt sich bei Verwendung aller Testsätze eine Senkung der Antistreptolysinwerte der Seren erreichen, die statistisch abgesichert ist ($p < 0,0003$).

3.6 Vergleich der mit BAG und HYL Testsatz in der Routine = methode ermittelten Antistreptolysintiter mit denen, die mit dem BEH Testsatz nach Fällung erzielt wurden

Zusätzlich wurden die Ergebnisse der Antistreptolysinbestimmung mit dem BEH Testsatz nach Fällung der Seren mit Dextransulfat (Abb. 15) und Isoamylalkohol (Abb. 16) verglichen mit den Werten, die bei Verwendung des BAG und HYL Testsatzes ohne Fällung ermittelt wurden.

Abb. 15 : Vergleich der mit BEH Reagenzien in der Dex =
transulfatmethode ermittelten mit den mit BAG
bzw. HYL Reagenzien in der Routinemethode er =
mittelten Antistreptolysinwerten der 100 unter =
suchten Seren

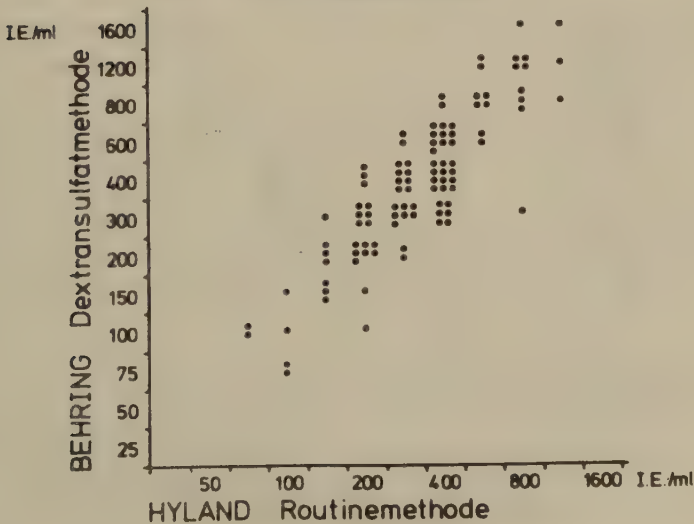
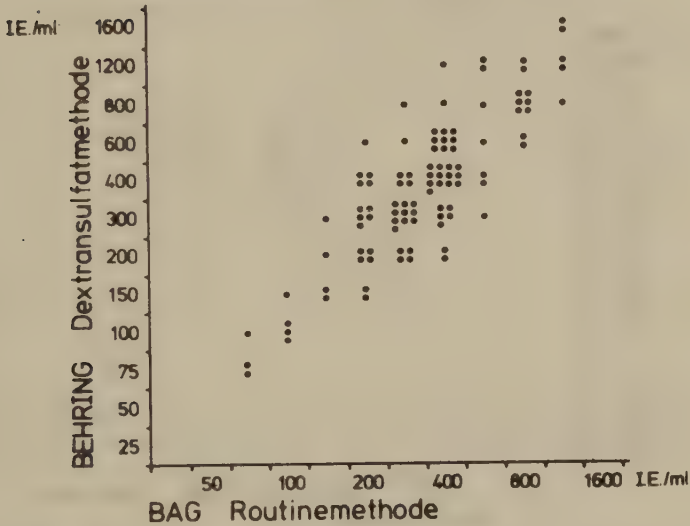


Abb. 16 : Vergleich der mit BEH Reagenzien in der Iso = amyalkoholmethode ermittelten mit den mit BAG bzw. HYL Reagenzien in der Routinemethode er = mittelten Antistreptolysinwerten der 100 unter = suchten Seren

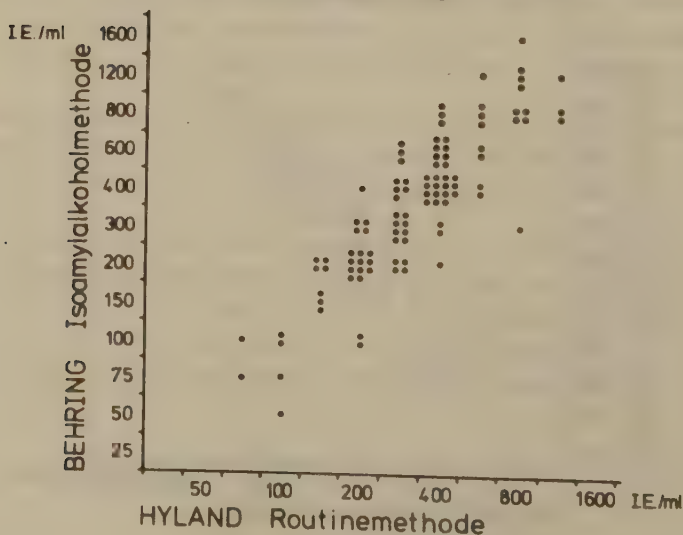
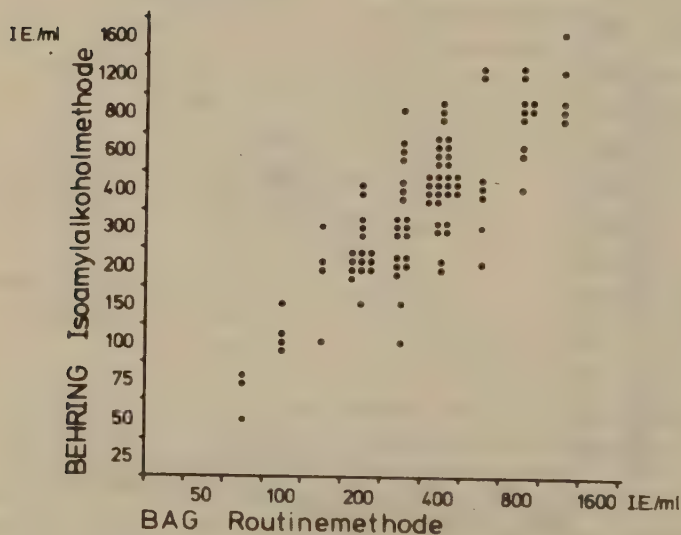


Abb. 17 : Vergleich der mit dem BEH Testsatz nach Fällung der Seren ermittelten mit den mit HYL und BAG in der Routinemethode ermittelten Antistreptolysintitern

	Anzahl der Seren in %, die um 1 Titerstufe und mehr voneinander differieren	
	höher	niedriger
BEH - DS / BAG - R	38 (12) ¹	19 (3)
/ HYL - R	50 (11)	14 (2)
BEH - I / BAG - R	32 (12)	27 (7)
/ HYL - R	37 (9)	16 (5)

¹In Klammern ist der Prozentsatz der Seren angegeben, die um 2 Titerstufen und mehr voneinander differieren.

Die mit dem BEH Testsatz ermittelten Antistreptolysin =
werte unterscheiden sich nach Fällung mit Dextransulfat
($p < 0,0001$) und Isoamylalkohol ($p = 0,0016$) noch
signifikant von denen, die mit dem HYL Testsatz in der
Routinemethode ermittelt wurden.

Auch die mit der Isoamylalkoholmethode beim BEH Testsatz
erzielten Titer unterscheiden sich signifikant von denen,
die mit dem BAG Testsatz in der Routinemethode ermittelt
wurden ($p = 0,0013$).

Lediglich zwischen BAG Routinemethode und BEH Isoamylal =
koholmethode bestehen keine statistisch absicherbaren
Unterschiede ($p = 0,10$).

Abb. 18 : Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse des WILCOXON Testes

Beobachtungspaare	Umfang der Stichprobe	beobachteter Wert für die kleinere der beiden Rang = summen	Erwartungswert für die kleinere der beiden Rang = summen unter H_0	p - Wert
HYL - R / BAG - R	53	528,5	715,5	0,0489 n.s.
/ BEH - R	71	133,0	1278,0	0,0001
HYL - D / BAG - D	61	661,0	945,5	0,0205 n.s.
/ BEH - D	70	118,5	1242,5	0,0001
HYL - I / BAG - I	69	1169,5	1207,5	0,4101 n.s.
/ BEH - I	77	398,5	1501,5	0,0001
HYL - R / HYL - D	50	83,5	637,0	0,0001
/ HYL - I	58	193,5	855,5	0,0001
BEH - R / BEH - D	53	328,0	715,5	0,0003
/ BEH - I	50	116,0	637,5	0,0001
BAG - R / BAG - D	49	122,0	612,5	0,0001
/ BAG - I	58	61,0	855,5	0,0001
HYL - R / BEH - D	64	318,5	1040,0	0,0001
/ BEH - I	52	364,5	689,0	0,0016
BAG - R / BEH - D	56	427,5	798,0	0,0013
/ BEH - I	59	716,0	885,0	0,1010 n.s.

R = Routinemethode, D = Dextransulfatmethode, I = Isoamylalkoholmethode

n.s. = nicht signifikant zu $\alpha' = 0,003$

4. Diskussion der Ergebnisse

Trotz des Anspruches der Reagenzienhersteller durch einen Vergleich des Reaktionsausfalles des Patientenserums mit dem eines Standardserums bei BAG und BEH, bzw. durch indirekte Standardisierung des Streptolysin O Reagenzes bei HYL, das Ergebnis der Antistreptolysinreaktion in I.E./ml angeben zu können, ergaben sich in unserer Untersuchung bei Verwendung der drei Testsätze Unterschiede in den Titerhöhen.

Die mit dem BEH Testsatz ermittelten Antistreptolysinwerte der untersuchten Seren liegen höher ($p < 0,003$) als bei der Verwendung des BAG oder HYL Testsatzes in der entsprechenden Methode, während sich dieser Unterschied bei Betrachtung der Titer, die mit BAG und HYL Reagenzien erzielt wurden, nicht zeigt (Routinemethode $p = 0,048$, Dextransulfatmethode $p = 0,020$, Isoamylalkoholmethode $p = 0,41$).

Auch von KLEIN et al. wurden bei der Bestimmung des Antistreptolysintiters in der Mikromethode mit BEH Reagenzien höhere Ergebnisse beobachtet als bei der Verwendung anderer Testreagenzien (28).

Ein einzelner Befund einer Antistreptolysintiterbestimmung ist unabhängig von der Titerhöhe nicht beweisend für das Vorliegen einer Streptokokkeninfektion. KLEIN fordert daher einen zweifachen Titeranstieg, einem $0,3 \log_{10}$ Titerabstand in seinem Serumverdünnungsschema entsprechend, als Beweis für eine Streptokokkensensibilisierung (29).

Eine Einzelbestimmung eines Antistreptolysintiters kann nur ein Anhalt sein, zumal nicht bekannt ist, ob man sich in der Titeranstiegsphase oder in der Phase des Titerabfalls befindet. Betrachtet man die Streptolysin O Antikörperkinetik, so ist ein Antikörpernachweis frühestens zwei Wochen nach Infektion durch Streptokokken zu führen. Das Antikörpermaximum wird meist zwischen der dritten

und sechsten Woche erreicht (33, 70, 75).

Davon abweichend sind aber auch andere Verläufe möglich, abhängig von der Lokalisation des Erregers im Organismus (13, 39, 46, 66, 74, 75).

KLEIN et al. geben als obere Normgrenze für den Antistreptolysin-titer, der in der Mikrotechnik mit der kompletten Neutralisationshemmung bestimmt wurde, einen Wert von

- 85 I.E./ml für das Vorschulalter,
- 170 I.E./ml für das Schulalter und
- 85 I.E./ml für das Erwachsenenalter an (27).

Erfolgt die Antistreptolysinbestimmung mit der Makrotechnik nach RANTZ et al., so gelten auf Grund des anderen Verdünnungsschemas

- 100 I.E./ml für das Vorschulalter,
- 166 I.E./ml für das Schulalter und
- 100 I.E./ml für das Erwachsenenalter (74).

Neben der Abhängigkeit des " Normaltiters " des Antistreptolysin O vom gewählten Verdünnungsschema und dem Alter des betreffenden Patienten wird von verschiedenen Autoren noch auf eine geographische und jahreszeitliche Abhängigkeit hingewiesen (6, 11, 33, 47, 56). Im allgemeinen wird ein Antistreptolysinwert von 200 I.E./ml als obere Grenze der Norm betrachtet (23, 35, 49, 62). Bewertet man den Ausfall der Antistreptolysinreaktion

- 200 I.E./ml : negativ,

- 200 - 300 I.E./ml : mäßig erhöht, Kontrolle nach einer Woche und

- 400 I.E./ml : stark erhöht,

so könnte im ungünstigsten Fall bei einem Untersucher = wechsel ein mit BAG oder HYL Testsatz als " mäßig erhöhtes " ermitteltes Ergebnis bei einer erneuten Untersuchung, jetzt mit dem BEH Testsatz, als " stark erhöht " bestimmt werden und damit einen Titeranstieg, gleichzusetzen mit einer akuten Streptokokkeninfektion, vor = täuschen.

Desgleichen könnte bei einer Verlaufskontrolle des Anti =

streptolysintiters das mit dem BEH Testsatz als " erhöht " ermittelte Ergebnis im Wiederholungsfalle, jetzt mit BAG oder HYL Reagenzien als " negativ " bewertet, einen Titerabfall vortäuschen.

Geht man von der Voraussetzung aus, daß sowohl Substanz bei BAG und BEH als auch das Streptolysin O bei HYL exakt auf den Internationalen Standard abgestimmt sind, so muß die Ursache für den differenten Ausfall der Ergebnisse bei Verwendung der verschiedenen Testsätze in einer unterschiedlichen Empfindlichkeit der Testsysteme auf im Serum vorkommende Störfaktoren beruhen.

Bereits 1939 wiesen HEWITT und TODD auf unspezifische Titeranstiege bei bakteriell kontaminierten Seren durch eine proteolytische Änderung der Serumlipide hin (21). PACKALEN stellte 1948 die Hypothese auf, daß durch chemische und enzymatische Einflüsse der Lipoproteinkomplex eines Serums so verändert werden kann, daß reaktive Hydroxylgruppen am C_3 - Atom des Cholesterins frei werden. Das Streptolysin O kann sowohl mit diesen freigeordneten OH - Gruppen als auch mit der C_3 - Hydroxylgruppe des Cholesterins der Erythrozytenmembran reagieren, womit es zu einem Mehrverbrauch an Streptolysin O kommt, der einen erhöhten Antistreptolysintiter vortäuscht (44). RUDOLPH konnte 1962 beweisen, daß die Steranconfiguration eines Stoffes allein nicht ausreicht, um die Antistreptolysinreaktion unspezifisch zu beeinflussen. Weiterhin zeigte er auf, daß die unspezifischen Hämolyseinhibitoren das Streptolysin O nicht an der gleichen Stelle im Molekül wie die spezifischen Antikörper blockieren (51). PETERSEN et al. sahen 1966 die Ursache für die unspezifische Streptolysin O Hemmung in der kombinierten Wirkung von im Serum enthaltenem Cholesterin und Phosphatiden (45).

Da ein unspezifisch erhöhter Antistreptolysintiter differentialdiagnostisch und hinsichtlich der Beurteilung

des Therapieerfolges einen falschen Rückschluß nach sich zieht, wurden Verfahren zur Ausfällung der Lipoproteide entwickelt.

BURSTEIN et al. legten 1958 das Dextransulfatverfahren zur Abgrenzung unspezifischer und spezifischer Hemmung des Streptolysin O Reagenzes vor (7).

CABAU et al. schlugen 1959 das Albuminverfahren vor (8).

Vergleichsuntersuchungen von LEGLER 1969 zwischen dem Albumin - und Dextransulfatverfahren zeigten nach Dex = transulfatfällung der Lipoproteide eine stärkere Absen = kung des Antistreptolysintiters (36).

1970 konnte KINDLER aufzeigen, daß durch Dextransulfat = fällung die β - Lipoproteide insgesamt und die α_1 - Li = poproteide teilweise eliminiert werden konnten (27).

BADIN gab 1969 an, durch eine Behandlung der Seren mit Isoamylalkohol eine vollständige Eliminierung der Lipo = proteide zu erreichen (4).

Neben verschiedenen Modifikationen der Antistreptolysin = reaktion, die sich hinsichtlich der Serumverdünnungs = stufen, des pH des Puffers und der verschiedenen langen Inkubationszeiten unterscheiden, scheint der Ablesemodus des Reaktionsergebnisses eine wichtige Rolle zu spielen. Während bei den von TODD (73), HODGE (22), COBURN (10), RANTZ (48) und SPAUN (60) beschriebenen Mo = difikationen die höchste Serumverdünnung, bei der noch eine komplette Hämolysehemmung vorliegt, dem Antistrep = tolysinintiter entspricht (100 %ige Hämolysehemmungsmetho = de), definierten andere Untersucher den Endpunkt der Antigen - Antikörperreaktion als die Serumverdünnung, bei der das vorhandene Antistreptolysin O gerade nicht mehr ausreicht, das hinzugegebene Streptolysin O zu neu = tralisieren (50 %ige Hämolysehemmungsmethode), wie HERBERT (20), IPSEN (24), PACKALEN (44), LIAO (37), KALBAK (25), KÖHLER (33), SCHEIFFARTH (55), SCHULTZE (57) und LEGLER (35).

Nach Untersuchungen von BABA et al. soll der unspezifische, titererhöhende Effekt von im Patientenserum enthaltenen Hämolyseinhibitoren, speziell der Lipoproteine, nur dann wirksam werden, wenn mit der 50 %igen Hämolysehemmungsmethode gearbeitet wird (2). Bei der Bestimmung des Antistreptolysintiters mit der kompletten Hämolysehemmungsmethode soll der hämolysehemmende Effekt der Lipoproteine zu vernachlässigen sein, d.h. eine Vorbehandlung der Seren zur Ausschaltung der Inhibitoren könnte entfallen.

Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Testsätze auf im Serum verbliebene Störfaktoren könnte eventuell auf einer verschiedenen Konzentration des im Test eingesetzten Streptolysin O Reagenzes beruhen.

Je geringer der Anteil der Störfaktoren im Serum, desto weniger wird der Antistreptolysintiter durch eine unspezifische Reaktion beeinflusst.

Umgekehrt kann man annehmen, daß, je höher die in dem Testsatz eingesetzte Streptolysin O Konzentration bei gleichbleibender Lipoproteinkonzentration ist, die hämolysehemmende Wirkung der Störfaktoren weniger Einfluß hat.

Wenn der Antistreptolysintiter eines Serums mit Testsätzen bestimmt wird, die mit unterschiedlicher Streptolysin O Konzentration arbeiten, so muß die unspezifische Hämolysehemmwirkung am deutlichsten in dem Testsatz sichtbar sein, der die geringste Streptolysin O Menge enthält. Vergleicht man die mit den Testsätzen der Firmen BAG, BEH und HYL ermittelten Antistreptolysintiter, so liegen die Ergebnisse bei BEH höher als bei den beiden anderen Firmen.

Erklärt werden könnte dies dadurch, daß die im Test eingesetzte Streptolysin O Konzentration bei BEH geringer, und damit der Einfluß der β - Lipoproteine ausgeprägter ist.

Der Effekt der unspezifischen Hämolysehemmfaktoren auf den Antistreptolysintiter der untersuchten Seren ist bei Verwendung des BEH Testsatzes so stark, daß selbst nach Fällung mit Dextransulfat noch signifikante Unterschiede in der Titerhöhe im Vergleich zum BAG oder HYL Testsatz in der Routinemethode bestehen bleiben.

Lediglich nach Isoamylalkoholfällung der untersuchten Seren kommt es zu einer Angleichung der Antistreptolysintiter zwischen BEH und BAG Routinemethode.

Durch die Ausschaltung der unspezifischen Hämolysehemmfaktoren mit der Dextransulfatfällung bzw. mit der Isoamylalkoholfällung müßten sich folglich die mit den verschiedenen Testsätzen ermittelten Antistreptolysintiter angleichen.

Es konnte durch die Serumvorbehandlung bei allen Testsätzen eine statistisch gesicherte Absenkung des Antistreptolysintiters erreicht werden, d.h. der Anteil der spezifischen Antigen - Antikörper - Reaktionen erhöht werden. Dennoch blieben die in der Routinemethode beobachteten Differenzen zwischen den mit den verschiedenen Reagenziensätzen ermittelten Titer bestehen.

Dies läßt den Schluß zu, daß zwar eine Reduktion der unspezifischen Inhibitoren erfolgte, aber der verbleibende Teil, je nach verwendetem Reagenziensatz, eine mehr oder weniger starke Beeinflussung des Antistreptolysintiters bewirkt.

Aus unseren Untersuchungen sind folgende Konsequenzen abzuleiten : Um eine Vergleichbarkeit der Testresultate, insbesondere bei Untersucherwechsel zu erreichen, scheint es erforderlich, die Methodik zur Bestimmung des Antistreptolysintiters zu standardisieren. Hierfür ist es notwendig, die Vorbehandlung der Serumproben, die technische Durchführung des Testes, sowie den Ablesemodus der Testresultate zu vereinheitlichen.

5. Zusammenfassung

An 100 Seren wurde in der Mikrotechnik mit verschiedenen handelsüblichen Reagenziensätzen der Antistreptolysin-Titer bestimmt. Dabei beobachtete Titerdifferenzen blieben auch nach Vorbehandlung der Seren mit Dextran-sulfat und Isoamylalkohol zur Ausschaltung unspezifischer, die Antistreptolysinreaktion störender Faktoren, bestehen. Die möglichen Ursachen für diese Titerdiskrepanzen wurden untersucht und diskutiert.

Eine Vereinheitlichung der Antistreptolysinreaktion in Bezug auf Testdurchführung und Ablesemodus des Testresultates ist anzustreben, zumindest sollte bei der Befundung angegeben werden, ob das untersuchte Serum vorbehandelt wurde, und ob das Ergebnis als 100 %ige oder als 50 %ige Hämolysehemmung im Test abgelesen wurde.

6. Literaturverzeichnis

1. AYOUB, E.M., L.M. WANNAMAKER

Evaluation of the streptococcal desoxyribonuclease B and diphosphopyridine nucleotidase antibody tests in acute rheumatic fever and glomerulonephritis
Pediatrics 29, 527 - 538 (1962)

2. BABA, T., M. SUZUKI, H. SONOZAKI, G. SCHRÖTER, M. TORISU

The effect of beta - lipoprotein on antistrep =
tolysin antibody titers
Japan. J. Microbiol. 17, 257 - 264 (1973)

3. BACH, G.L., R.A. WIATR, T.O. ANDERSEN et al.

The latex ASO test : A rapid screening procedure for the detection of elevated antistrep =
tolysin O titers
Techn. Bull. Regist. Med. Techn. 39, 126 - 128
(1969)

4. BADIN, J., A. BARILLEC

Dosage spécifique de l'antistreptolysine O sé =
rique après élimination des lipoprotéins par l'
alcool isoamylique
Ann. Biol. Clin. 27, 395 - 402 (1969)

5. BLENNEMANN, H., K. WIEBECKE

Antistreptolysinreaktion im Routinelaboratorium,
Mikromethode und Spezifizierung
Ärztl. Lab. 17, 358 - 363 (1971)

6. BÖSZÖRMENYI, J.

Antistreptolysin - O titer of healthy adults
in Budapest
Acta Microbiol. Acad. Scient. Hung. 8, 243
(1961)

7. BURSTEIN, M., J. SAMAILLE
Sur une nouvelle méthode de dosage des beta -
lipoprotéins du sérum
Path. et Biol. 6, 541 - 549 (1958)
8. CABAU, N., J. BADIN
Effets de l'addition d'albumin sur l'inhibition
spécifique et non spécifique de la streptolysine
O par le sérum humain
C. R. Soc. Biol. 153, 390 (1959)
9. CAMPBELL, J.D., W. PURDON, A.M. GORDON
An evaluation of a new technique for the esti =
mation of antistreptolysin O titer
Med. Lab. Techn. 32, 219 - 223 (1975)
10. COBURN, A.F., R.H. PAULI
Studies on the immune response of the rheuma =
tic subjects and its relationship to activity
of the rheumatic process
J. Exp. Med. 62, 129 - 136 (1935)
11. COBURN, A.F., R.H. PAULI
Limited observations on the antistreptolysin
titer in relation to latitude
J. Immunol. 29, 515 - 521 (1935)
12. COLLINS, O.D.
Antistreptolysin O determination by sheep cell
agglutination
Am. J. Clin. Pathol. 57, 598 - 602 (1972)
13. DILLON, H.C., M.S.A. REEVES
Streptococcal immune response in nephritis
after skin infection
Am. J. Med. 56, 333 - 346 (1974)
14. DRABKIN, D.L., J.H. AUSTIN
J. Biol. Ch. 112, 51 (1935)

15. EDWARDS, E.A.

Protocol for micro antistreptolysin O determi =
nations

J. Bacteriol. 87, 1254 - 1255 (1964)

16. ELIAS, A., E. CIOLAC - MUNTEANU, J. IACOBICIU,
Z. LAZAR, A. SARLAU

Die Seruminhibitoren des Streptolysin O in der
akuten Hepatitis epidemica

Arch. Hyg. 154, 52 - 57 (1970)

17. HÄLLEN, J.

Non - specific streptolysin O inhibition in
diseases of the liver and biliary system

Acta path. microbiol. Scand. 57, 301 - 306
(1963)

18. HALL, E.C., M.B. FELKER

Reproducibility in the serological laboratory
Health Laboratory Science (New York) 7, 63 -
68 (1970)

19. HALLMANN, L., F. BURKHARDT

Klin. Mikrobiologie, 4. Aufl., Georg Thieme
Verlag, Stuttgart (1974)

20. HERBERT, D.A.

A simple colorimetric method for the estimation
of hemolysis and its application to the studie
of streptolysin

Bioch. J. 35, 1116 - 1123 (1941)

21. HEWITT, L.F., E.W. TODD

The effect of cholesterol and of sera contami =
nated with bacteria on the hemolysins produced
by hemolytic streptococci

J. Path. Bact. 49, 45 - 63 (1939)

22. HODGE, B.E., H.F. SWIFT

Varying hemolytic and constant combining capacity of streptolysins; influence on testing for antistreptolysins
J. Exp. Med. 58, 277 - 287 (1953)

23. INGESTAD, R., S. WINBLAD

Normal values of antistreptolysin and anti-staphylosin titers as studied over 4,5 years in sera of healthy blood donors
Acta path. microbiol. Scand. 57, 455 - 464
(1963)

24. IPSEN, J.

A standard for antistreptolysin O of human serum, and its practical application
Acta path. microbiol. Scand. 21, 203 - 213
(1944)

25. KALBAK, K.

The antistreptolysin reaction (ASR)
I. Technique
The State Serum Institute Copenhagen (1947)

26. KINDLER, U.

Die klinische Wertigkeit einer modifizierten Antistreptolysintiter - Reaktion
Dtsch. med. Wschr. 95, 2115 - 2118 (1970)

27. KLEIN, G.C., C.N. BAKER, W.L. JONES

Upper limits of normal antistreptolysin O and antideoxyribonuclease B titers
Appl. Microbiol. 21, 999 - 1001 (1971)

28. KLEIN, G.C., C.N. BAKER, M.D. MOODY

Comparison of ASO latex screening test with ASO hemolytic test
Appl. Microbiol. 19, 60 - 61 (1970)

29. KLEIN, G.C.
Manual of clinical immunology, edited by
N.R. ROSE and H.F. FRIEDMANN, Washington
(1976)
30. KLEIN, G.C., E.C. HALL, C.N. BAKER, B.V. ADDISON
Antistreptolysin O test, comparison of micro
and macro technics
Am. J. Clin. Path. 53, 159 - 162 (1970)
31. KLEIN, G.C., W.L. JONES
Comparison of the streptozyme test with the
antistreptolysin O, antideoxyribonuclease B
and antihyaluronidase test
Appl. Microbiol. 21, 257 (1971)
32. KLEIN, G.C., M.D. MOODY, C.N. BAKER, B.V. ADDISON
Micro antistreptolysin O test
Appl. Microbiol. 16, 184 (1968)
33. KÖHLER, W.
Die Serologie des Rheumatismus und der Strepto =
kokkeninfektionen
J.A. Barth Verlag Leipzig, 3. Auflage (1963)
34. KRÖGER, E., K.H. EILERS
Zur Serodiagnostik des rheumatischen Fiebers;
Ergebnisse von Antistreptolysin - und Anti =
streptokokken - NADase - Reaktion
Ärztl. Lab. 4, 155 - 160 (1971)
35. LEGLER, F.
Erfahrungen mit der Antistreptolysinreaktion
Z. Immunforschg 112, 99 - 121 (1955)
36. LEGLER, F.
Die Bewertung des Antistreptolysintiters bei
Anwendung der Dextransulfatfällung
Z. Immunforschg 138, 161 - 168 (1969)

37. LIAO, S.J.

A modification of the antistreptolysin test
J. Lab. Clin. Med. 38, 648 - 659 (1951)

38. LÖFGREN, S.

Bacterial contamination of blood samples as
a source of error in antistreptolysin titra =
tion
Acta path. microbiol. Scand. 21, 768 - 774
(1944)

39. MARKOWITZ, M., H.D. BRUTON, A.G. KUTTNER, L.E. CLUFF

The bacteriologic findings, streptococcal im =
mune response, and renal complications in
children with impetigo
Pediatrics 35, 393 - 404 (1965)

40. MATHIES, H.

Praktische Rheumaserologie
Ärztl. Lab. 13, 229 - 239 (1967)

41. MATHIES, H., H. GAEDICKE

Die Latex - ASL - Reaktion zur groben Diffe =
renzierung normaler und pathologischer Anti =
streptolysintiter
Med. Klin. 63, 165 - 167 (1968)

42. NAUMANN, G., D. SANDOW

Die Beeinflussung des Antistreptolysin - O -
Gehaltes durch infizierte Seren
Z. Gesamte Hyg. 15, 622 - 624 (1969)

43. OKER - BLOM, N., E. NIKKALA, T. KALAJA

Non - specific antistreptolysin reaction in
hepatitis sera. Antistreptolysin titers before
and after removal of lipids from the hepatitis
sera with bentonite
Ann. Med. exp. Fennl. 28, 107 (1950)

44. PACKALEN, T.
Nonspecific antistreptolysin reactions and
serum (or pleural exsudate) cholesterol
J. Bact. 56, 143 - 156 (1948)
45. PETERSEN, K.F., P. NOWAK, O.W. THIELE, B. URBASCHECK
Investigations concerning the action of strep =
tolysin O and its unspecific inhibition by
lipids
Int. Arch. Allergy 29, 69 - 81 (1966)
46. RAMMELKAMP, C.H.Jr., B.L. STOLZER
The latent period before the onset of acute
rheumatic fever
Yale J. Biol. Med. 34, 386 - 398 (1961)
47. RANTZ, L., J. DICAPRIO, E. RANDALL
Antistreptolysin O and antihyaluronidase titers
in health and various diseases
Am. J. med. Sci. 224, 194 (1952)
48. RANTZ, L., E. RANDALL
A modification of the technic for determination
of the antistreptolysin titer
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 59, 22 - 25
(1945)
49. REISSMANN, M., K. REISSMANN, H. TRENCKMANN
Die Antistreptolysintiter unter Anwendung der
herkömmlichen Methode und nach Absättigung mit
Dextransulfat
Inn. Med. 30, 524 - 528 (1975)
50. RICHTERICH
Klinische Chemie, S. Karger Verlag, 3. Auflage
(1971)

51. RUDOLPH, F.
Unspezifisch erhöhte Antistreptolysintiter in
bakteriell infizierten Seren
Z. Immunforsch 124, 249 (1962)
52. RUST, J.H.J., E.B. BLAIR, D.H. HUNTER
Microtechnique for antistreptolysin titrations
Bacteriol. Proc. 80 (1962)
53. SAUL, F., R. SONAK, W. RITZERFELD
Blue - ASO - Test, Erfahrungsbericht über eine
neue Bestimmungsmethode des Antistreptolysin O
Titers
Ärztl. Lab. 23, 407 - 411 (1977)
54. SCHEIFFARTH, F., G. BERG, F. LEGLER, G. PETERSMANN
Untersuchungen über die Bedeutung der Serumli =
pide für den Antistreptolysintiter
Klin. Wschr. 35, 412 - 415 (1957)
55. SCHEIFFARTH, F., F. LEGLER
Serologie und klinische Erfahrungen mit der
Antistreptolysinreaktion
Ärztl. Wschr. 2, 660 (1951)
56. SCHMID, W.
Ein Beitrag zum Antistreptolysin - Normaltiter
in Südwest - Deutschland
Z. Immunforsch 117, 401 (1959)
57. SCHULTZE, H.E., G. SCHWICK, H. VASTERS
Nachweis von Antistreptolysin O mit stabilem
Trockenantigen
Ärztl. Wschr. 9, 324 - 328 (1954)
58. SCHWAB, A., K. FEHR, A. BÖNI
Der Antistreptolysin O Latextest
Z. Rheumatol. 34, 76 - 78 (1975)

59. SIEBELIST

Z. Gesamte Hyg. 9, 866 - 875 (1963)

60. SPAUN, J., M.W. BENTSON, S. OLESEN LARSEN, L.F. HEWITT
The International Standard for Antistreptolysin O
(Results of a collaborative study in ten laboratories)

Bull. Wld Hlth Org. 24, 271 - 279 (1961)

61. STILLE, W.

Antistreptolysinbestimmung mit rationalisieren =
der Mikrotechnik

Ärztl. Lab. 13, 332 - 335 (1967)

62. STÖRIKO, K., G. UHLEMANN

Serologische Reaktionen zur Diagnose rheumatischer Krankheiten

Behringwerke A.G. Frankfurt, Med. Inf. und Vertrieb (1975)

63. STOLLERMANN, G.

The use of hemolysis inhibition in the study of
experimental and clinical hyperlipämia; the
nonspecific inhibition of streptolysin O by
serum lipoproteins

J. Clin. Invest. 33, 1233 (1954)

64. STOLLERMANN, G.H., A.J. LEWIS, J. SCHULTZ, A. TARANTÀ
Relationship of immune response to group A
streptococci to the course of acute, chronic
and recurrent rheumatic fever

Am. J. Med. 20, 163 - 169 (1956)

65. SWIFT, H.F.

Relationship of streptococcal infections to
rheumatic fever

Am. J. Med. 2, 168 - 189 (1947)

66. TARANTA, A.

Relation of isolated recurrences of Sydenham's
Chorea to proceeding streptococcal infections
New England J. Med. 260, 1204 - 1210 (1959)

67. TAUBNER, A., G. KLEIN, H. LINDNER

Welche diagnostische Möglichkeit bietet die
Serologie rheumatischer Erkrankungen
Ärztl. Mitt. (Köln), 57 - 59, 1809 - 1814
(1962)

68. TEICHMANN, W.

Über die Ergebnisse der Antistreptolysinreaktion
bei Hepatitis epidemica
Ärztl. Lab. 2, 353 - 355 (1956)

69. THIELE, O.W., K.F. PETERSEN, P. NOWAK, B. URBASCHECK

Studies on the unspecific inhibition of strep =
tolysin by lipids
Biochim. biophys. (Amsterdam) 166, 427 - 429
(1965)

70. TICHY, H.

Beiträge zur Rheumatologie IV, VEB Verlag Volk
und Gesundheit Berlin (1961)

71. TIESLER, E.

Ergänzende Diagnostik bei Verdacht auf A - Strep =
tokokkenerkrankungen
Dtsch. Ärztebl. 72, 3239 (1975)

72. TIESLER, E., M. HEPP

Vergleich der Aussagekraft von vier immunolo =
gischen Nachweismethoden (AST, ADNase B, AHY
und ANADase) bei A - Streptokokkeninfektionen
und ihre Bedeutung für die Routinediagnostik
Imm. und Infektion 4, 190 - 195 (1976)

73. TODD, E.W.

Antigenic streptococcal hemolysin
J. Exp. Med. 55, 267 - 280 (1932)

74. WANNAMAKER, L.W.

Differences between streptococcal infections
of the throat and of the skin
New England J. Med. 282, 78 - 85 (1970)

75. WANNAMAKER, L.W., E.M. AYOUB

Antibody titers in acute rheumatic fever
Circulation 21, 598 - 614 (1960)

76. WEBER, E.

Grundriß der biologischen Statistik, Gustav
Fischer Verlag Stuttgart, 6. Auflage (1967)

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. P. Naumann für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. H.-J. Hagedorn für seinen fachlichen Rat und seine geduldige Betreuung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 13.1.1950 wurde ich, Wilhelm Friedrich Burbach, als einziges Kind des Schreiners Heinrich Mathias Burbach und seiner Ehefrau Maria Gertrud Burbach, geb. Linken, in Gustorf geboren.

Von 1956 bis 1961 besucht ich die Volksschule in Gustorf. 1961 wechselte ich zum Kreisgymnasium Grevenbroich und erwarb dort am 26.5.1969 das Reifezeugnis.

Von 1969 bis 1971 machte ich eine Lehre als Apotheker = praktikant, die ich mit der Pharmazeutischen Vorprüfung am 2.9.1971 abschloß. Von 1971 bis 1973 war ich als Pharmazeutischer Assistent tätig.

Seit dem Sommersemester 1974 studierte ich an der Universität Düsseldorf Humanmedizin. Sommersemester 1976 legte ich dort die Ärztliche Vorprüfung, Sommersemester 1977 den ersten Abschnitt und Sommersemester 1979 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Von 1979 bis 1980 absolvierte ich an den Städtischen Krankenanstalten Krefeld das Praktische Jahr mit dem Wahlfach Gynäkologie. Am 10.4.1980 legte ich den schriftlichen und am 21.4.1980 den mündlichen Teil des dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung ab.

Ich bin seit 1974 verheiratet mit Elisabeth Burbach, geb. Stöcker. Wir haben ein Kind.

